

9 6 4 9 塩が食品ゲルの力学物性に及ぼす影響に関するフラクタル的解析

助成研究者：中村 厚三(東京大学 大学院農学生命科学研究科)
 共同研究者：熊谷 仁(東京大学 大学院農学生命科学研究科)

【目的】

食塩などの塩は、粘度や弾性率などの力学物性に大きな影響を及ぼす。これまで、塩添加が食品の力学物性に及ぼす影響に関しては多くの研究例があるが、未だその機構に関しては十分に明らかにされていない。その理由は従来の研究のほとんどが添加塩の量などの食品組成と力学物性の測定値との相関を取るにとどまっているためと考えられる。塩が力学物性に及ぼす影響を系統的に把握するためには、食品内部のミクロ構造をとらえつつ力学物性の挙動を解析することが重要であるがそうした研究例は少ない。特に、食品ゲルの場合、内部構造が複雑で不規則なため、ミクロ構造を定量的にとらえる手段が未だ確立されていない。

近年、不規則構造を定量化する方法としてフラクタルの理論が着目されている。本研究では、球状タンパク質および塩添加物の凝集ゲルに関して、ゲル内部の凝集体のフラクタル構造をとらえ、ゲルの物性の1つである弾性率の挙動との関連について検討を行った。

【方法】

最初に、ゲルなどの濃厚系における凝集体の構造を理解するための基礎として、希薄タンパク質溶液を加熱することにより形成される凝集体のフラクタル構造に関して検討した。試料としては牛血清アルブミン(以下BSA)を用いた。実験は、希薄BSA溶液およびその塩添加物を加熱し、形成される凝集体のフラクタル構造を静的光散乱法(He-Neレーザー、波長632.8nm使用)によって測定し、フラクタル次元 D_f を算出し、クラスター・クラスター凝集モデルによる予測値と比較した。

次に、熱凝集ゲルを中心として、いくつかの食品タンパク質凝集ゲルおよびその塩添加物に関して、弾性率の濃度依存性からShihらの理論を用いてフラクタル次元 D_f の算出を行った。ゲルの弾性率は、レオメータを用いた単軸圧縮試験により測定した。また、凝集ゲル内部の凝集体構造をレーザー共焦点顕微鏡によって観察し、その画像をbox-counting法によって画像処理することにより凝集体の D_f を算出し、弾性率測定から求めた値と比較した。

【結果と考察】

1) 希薄BSA加熱凝集体のフラクタル解析

イオン強度が0.1MのNaCl添加した系において、BSAの等電点4.9からやや離れたpH7の条件下で生じた凝集体の D_f の値はクラスター・クラスター凝集モデルの一つである反応律速型凝集モデルの予測値2.1とほぼ一致した。また、NaCl濃度を増加するに従って(イオン強度1.0M程度まで)フラクタル次元は2.8程度まで増大した。このことは、NaCl濃度の増加が凝集体構造の再構成を促進していることを示唆している。一方、CaCl₂を添加した場合、本研究で用いた光散乱法によってはフラクタル構造が観測されなかった。このことは、ナトリウム塩とカルシウム塩とでは、凝集体構造に及ぼす影響が異なることを示唆している。

2) タンパク質凝集ゲルのフラクタル解析

画像処理により算出された D_f の値は、弾性率測定から算出された D_f の値とほぼ一致した。このことは、凝集ゲルの弾性率の挙動は、内部の凝集体のフラクタル構造の反映であることを示している。添加塩の種類・濃度を変えることにより、Shihの理論におけるstrong-link、weak-link両方のタイプの弾性挙動を示すゲルが得られることが確認され、得られた D_f の値は添加塩の濃度・種類によって異なる値を示した。

9 6 4 9 塩が食品ゲルの力学物性に及ぼす影響に関するフラクタル的解析

助成研究者：中村 厚三(東京大学 大学院農学生命科学研究科)
共同研究者：熊谷 仁(東京大学 大学院農学生命科学研究科)

1. 研究目的

粘度や弾性率などの食品の力学物性は、食品の食感すなわち嗜好面への関わりが強いのみでなく、輸送など食品製造プロセスにおける操作条件決定の際においても重要なパラメータとなる。食塩などの塩は、食品の保存性の向上や食品の味覚面での向上を目的として添加されるが、粘度や弾性率などの力学物性にも大きな影響を及ぼす。これまで、塩添加が食品の力学物性に及ぼす影響に関しては多くの研究例があるが、未だその機構に関しては十分に明らかにされていない。その理由は従来の研究のほとんどが添加塩の量などの食品組成と力学物性の測定値との相関を取るととどまっているためと思われる。添加塩は、静電遮蔽効果や食品の浸透圧を高めることにより、食品内部の各成分の分子構造・分子サイズ・空間分布などに変化を与え、その結果、力学物性を変化させると考えられる。塩が力学物性に及ぼす影響を系統的に把握するためには、食品内部のミクロ構造をとらえつつ力学物性の挙動を解析することが重要であるがそうした研究例は少ない。特に、ゲル状食品の場合、内部構造が複雑で不規則なため、ミクロ構造を定量的にとらえる手段が未だ確立されていない。

近年、不規則構造を定量化する方法としてフラクタルの理論が着目されている^{1,2)}。フラクタルとは、自己相似性の構造体の呼称であり、その構造は非整数次元であるフラクタル次元によって特徴づけられる。コロイド凝集体に関しても、希薄溶液から生じる凝集体の構造が、フラクタルの一種であるマスフラクタルとして記述可能なことが確認されている。しかし、食品タンパク質凝集体、特にゲルに関する検討例はほとんど見あたらない。

本研究では、球状タンパク質および塩添加物の凝集ゲルに関して、ゲル内部の凝集体のフラクタル構造をとらえ、ゲルの物性の1つである弾性率の挙動との関連について検討を行った。

2. 研究方法

2.1 希薄BSA溶液の加熱凝集体のフラクタル構造

希薄系におけるコロイド凝集体のフラクタル解析については、光散乱法等を用いた金コロイド凝集体^{3,4)}などに関する実験的なアプローチに加えて、クラスター・クラスター凝集モデル⁵⁻⁸⁾による理論的取り扱いも進んでいる。そうした希薄系についての検討は、ゲルなどの濃厚系における凝集体の構造を理解するための基礎としても重要である。しかしながら、タンパク質の凝集体に関するフラクタル解析が行なわれた例はそれほど多くない。そこで、本研究の最初に、光散乱法⁹⁻¹¹⁾を用い

て、ウシ血清アルブミン (以下BSAと略記) の希薄溶液を加熱することにより生じた凝集体のフラクタル解析を行なった。

2.1.1 試料の調製

試料の調製に用いた全てのガラス器具は、光散乱測定の際の障害となる塵やゴミの試料の混入を最大限防ぐため、超音波洗浄器で洗浄した後、超純水 (Millipore Co.) で数回すすぎ、更に孔径 $0.22\mu\text{m}$ のシリンジ・フィルター (Minisart RC、Sartorius AG) で濾過したアセトンですすぎ、無塵ブース内で乾かしてから用いた。

BSA (ref. 238040、Boehringer Mannheim GmbH) は、50 mM HEPES緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。その際、ナトリウム塩添加系については、イオン強度が設定値 (0.1M-1.0M) になるようにNaClを添加し、タンパク質濃度は0.1 % (w/w) とした。カルシウム塩添加系については、 CaCl_2 を30mM添加し、タンパク質濃度は0.001 % (w/w) に調製した。

溶解後、溶液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のシリンジ・フィルター (Minisart、Sartorius AG) で濾過し、ガラス製のバイアルに入れた。加熱時における水分の蒸発を防ぐため、孔径 $0.5\mu\text{m}$ のシリンジ・フィルター (Millex-SR、Millipore Co.) で濾過した0.1 mlのシリコン・オイルで試料の表面を覆った後、バイアルの栓を堅く閉めた。試料を $25.0\pm 0.1^\circ\text{C}$ の恒温槽で予備加熱した後、 $95.0\pm 0.2^\circ\text{C}$ の恒温槽内で加熱することにより、凝集体を形成させた。ある一定時間加熱した後、すばやく $25.0\pm 0.1^\circ\text{C}$ の恒温槽に試料を入れて冷却することにより、凝集体形成を止めた。

2.1.2 静的光散乱法

静的光散乱測定はSystem4700 (Malvern Co.) で行なった。光源には波長632.8 nmのヘリウム-ネオン・レーザー (日本電気製) を用いた。ナトリウム塩を添加した試料に関しては、多重散乱の影響を抑えるために、試料の調製に用いた緩衝液で100倍希釈 (重量比) して測定に供した。得られた試料は、測定用円筒型セルに入れ、測定機器にセットした。全ての測定は $25.0\pm 0.1^\circ\text{C}$ で行なった。

緩衝液の屈折率は、アッペ屈折率計((株)アタゴ、東京)で測定した。

静的光散乱は散乱角度 20° から 140° の範囲で測定を行なった。

2.1.3 フラクタル次元の算出法⁹⁻¹¹⁾

静的光散乱により測定される散乱光強度 $I(q)$ は、フラクタル次元 D_f と以下のように関係づけられる。

$$I(q) \propto q^{-D_f} \quad (1)$$

q は

$$q = (4\pi n_s / \lambda) \sin(\theta / 2) \quad (2)$$

で定義される散乱ベクトルである。ここで、 n_s は溶媒の屈折率、 λ は光源の波長、

θ は散乱角度である。(1)式により、 D_f の値は、 $I(q)$ と q 両対数プロットの傾きから算出される。

2.2 弾性率測定からのフラクタル次元の算出

2.2.1 コロイドゲルの弾性挙動に関するShihらの理論¹²⁾

コロイドゲル(凝集ゲル)の内部は、フラクタル構造を有するブロックから成り、ゲルの弾性特性は内部のブロックの弾性挙動によって決定されると仮定する。隣接ブロック間の結合強度とブロック内の結合強度を比較して、その結合をstrong-linkとweak-linkとに分類する。すなわち、隣接ブロック間の結合がブロック内の結合より強い場合をstrong-link、逆にブロック内の結合が隣接ブロック間の結合より強い場合をweak-linkと呼ぶ。strong-link領域のゲル(以下、strong-link gelと呼ぶ)においては、弾性率 E と線形限界歪み γ_0 の粒子濃度(ϕ ;本研究ではタンパク質)依存性は以下のように表される。

$$E \propto \phi^{(3+x)/(3-D_f)} \quad (3)$$

$$\gamma_0 \propto \phi^{-(1+x)/(3-D_f)} \quad (4)$$

ここで、 D_f はブロックのフラクタル次元($D_f \leq 3$)、 x はEffective backboneのフラクタル次元であり、コンピュータシミュレーションの結果から1から1.3の値をとることが確かめられている^{12,13)}。一方、weak-link領域のゲル(以下、weak-linkゲル)の場合、 E と γ_0 の濃度依存性は以下のように表される。

$$E \propto \phi^{1/(3-D_f)} \quad (5)$$

$$\gamma_0 \propto \phi^{1/(3-D_f)} \quad (6)$$

2.2.2 ゲルの弾性率測定

試料としては、BSA、 β -ラクトグロブリン(以下、 β -LG)、大豆タンパク質11Sグロブリン、カゼインを用いた。ゲルは、いずれも、外径28 mm、内径20 mmのガラス管を用い、高さ15mmのものを調製した。なお、ガラス管へのゲルの付着防止のため、ガラス管の表面をあらかじめシグマコート(Sigma Chemical Co.)でコーティングした。

BSAゲルの調製法は以下の通りである。希薄系の実験で用いたのと同様のBSAを次の4種類の50mM HEPES緩衝液(pH 7.0)に溶解した。

- (A)緩衝液のイオン強度が1.0 MになるようNaClを添加したもの
- (B)カルシウムイオン濃度が30mMになるようCaCl₂を添加したもの
- (C)カルシウムイオン濃度が5mMになるようCaCl₂を添加したもの
- (D)添加塩なし

溶解後、減圧下で3分間して脱気して、溶液中の気泡を取り除いた。次に、これらの溶液に少量の水酸化ナトリウム水溶液または塩酸を滴定して、pHが緩衝液のpH

になるように調節した。その溶液をガラス管に入れて両端をテフロン製の栓で強く封をし、50℃で60分予備加熱した後、95℃の恒温槽内で10分間加熱した。

β -LGは、牛乳由来のもの (L-6879, Sigma Chemical Co.) を用いた。

β -LGは次の3種類の50mM HEPES緩衝液(pH 7.0)に溶解した。

(A)緩衝液のイオン強度が1.0MになるようNaClを添加したもの

(B)カルシウムイオン濃度が30mMになるようCaCl₂を添加したもの

(C)添加塩なし

これらの溶液を、BSAと同様の処理をしてゲルを得た。

大豆タンパク質11Sグロブリンに関しては、試料を超純水に分散し沸騰水中で3分間加熱した後、すばやく氷冷水中で5分間冷却した。得られた試料は減圧下で3分間脱気して、試料中の気泡を取り除いた。次に、25℃でグルコノ- δ -ラク톤を、大豆タンパク質1gにつき0.1gの割合で試料に添加し、1分間攪拌した。BSAで用いたものと同様のガラス管に試料を入れ、両端を封をした。試料は70℃の恒温槽内で30分間加熱した。

カゼインのナトリウム塩は牛乳由来のもの (Casein, Sodium salt; C8654, Sigma Chemical Co.) を用いた。カゼインのナトリウム塩を超純水に分散させ、次に25℃でグルコノ- δ -ラク톤を、含有カゼイネート1gにつき0.25gの割合で、試料に添加し、1分間攪拌した。ガラス管に試料を入れ、両端をテフロン製の栓で強く封をした。

いずれのゲルも、25℃のシリコンオイル中に24時間静置後、弾性率測定に供した。

ゲルの弾性率は、単軸圧縮試験法により求めた。測定機器としてはRheoner RE-3305 (山電、東京) を用いた。ゲルは、測定中に水分が蒸発するのを防止するため、シリコンオイル槽に浸漬した。円筒形のゲルを直径30mmのポリアセタール樹脂製の平板プランジャーで、圧縮速度1mm/sで圧縮し、プランジャーに加わった応力を記録した。測定はすべて25℃で行った。歪みはゲルの変形量とゲルの初期高さの比として計算した。弾性率 E は、測定から得られた応力-歪み曲線の微小歪み領域における線型部分の傾きから計算した。

2.2.3 フラクタル次元 D_f の算出法

まず、線型限界歪み γ_0 をタンパク質濃度 ϕ に対してプロットした。(4)式および(6)式に示されているように γ_0 の値は、strong-linkゲルでは ϕ が増加するにつれ小さくなり、一方、weak-linkゲルでは大きくなるので、 γ_0 と ϕ の両対数プロットの傾きの符号から、対象としているゲルが、どちらのlinkのタイプであるかを判断した。この際、 γ_0 の正確な値を求めることは困難であるが、 D_f の算出のためには γ_0 と ϕ の両対数プロットの傾きの値の符号のみが必要なことから、本研究では、 E の算出のために引いた直線と応力-歪み曲線の縦座標の値との間のずれが5%となった歪

み γ の値を γ_0 として用いた。次に、strong-linkゲルの場合は(3)式を、weak-linkゲルの場合は(5)式を用いて、 ϕ に対するゲルの弾性率 E の両対数プロットの傾きから、 D_f を算出した。strong-linkゲルの場合、 D_f の算出には x の値が必要であるが、上述のように x の値は1から1.3の値を取り^{12,13)}、本実験の範囲内では D_f の値にほとんど影響を及ぼさないことから、 D_f の範囲を示した。

2.2.4 ゲル中の凝集体の画像解析によるフラクタル次元の算出

ニフトロン・テープ(日東電工、大阪)を切断して作製したスペーサー(厚さ0.18mm)付きの2枚のガラス板の隙間に、タンパク質溶液を注入した。ゲルをガラス板およびスペーサーから取り出し易くするために、あらかじめ、ガラス板に関してはシグマコート(Sigma Chemical Co.)で表面をコーティングし、スペーサーの表面には剥離剤としてシリコン・グリースを薄く塗布した。試料は95℃で10分間加熱し、次に25℃の恒温槽に浮かせたステンレス製のバットの上で冷却した。そのまま24時間静置した後、ゲル片を取り出し、およそ一辺が5 mmの正方形になるよう整形した。得られたゲルを、タンパク質の蛍光標識物質として知られている fluorescein isothiocyanate の溶液で染色した。染色処理を施したゲルは、顕微鏡観察用のスライドガラスにマウントした。カバーガラスをスペーサーとしてゲルの周囲四方に置き、さらに別のカバーガラスをスペーサーの上にのせた。カバーガラスを透明なマニキュアで固定したのち、共焦点顕微鏡観察に供した。

凝集体観察には、レーザー共焦点顕微鏡model MRC600 (Bio-lad Laboratories, Inc.)を用いた。観察によって得られた画像は、パーソナルコンピュータ Macintosh上で、画像解析ソフトウェアNIH Image program ver.1.59を用いて二値化した。二値化した画像から、box-counting法¹⁴⁾に基づき、フラクタル解析のコンピュータ・ソフトウェアFractal Dimension Calculatorを用いて、 D_f を算出した。なお、box-counting法の原理は以下の通りである。

- [1] 対象とする物体を含む画像一辺が L の正方形で分割する。
- [2] 対象とする物体を一部分でも含んでいる正方形の数 $N(L)$ を数える。
- [3] 二次元でのフラクタル次元 D は、以下の式の関係より、 L に対する $N(L)$ の両対数プロットの傾きから求められる。

$$N(L) = L^{-D} \quad (7)$$

三次元でのフラクタル次元 D_f は、 D に1を加えた値である。

3. 結果および考察

3.1 希薄BSA溶液における凝集体のフラクタル構造

Fig. 1に、NaCl添加系の静的光散乱測定の一例を示す。散乱強度 I と散乱ベクトル q との間には直線関係が見られ、この凝集体がフラクタル構造を有していることがわ

かる。直線の傾きから、(1)式によりフラクタル次元 D_f の値は2.19と求められた。

Table 1に、NaCl添加系の D_f の測定結果をまとめて示す。イオン強度0.1M、加熱時間90minの場合、 D_f の値は2.11であった。我々は既に、イオン強度0.1MのBSA希薄凝集体に関して、pHがBSAの等電点(4.9)¹⁵⁾に近い5.1の場合には、 $D_f=1.8$ 、pH7の場合には $D_f=2.1$ となり、それぞれがクラスター・クラスター凝集モデルの一種である拡散律速型凝集モデル、反応律速型凝集モデルの予測値と一致することを示した¹⁶⁾。この結果は、BSA分子の表面荷電の影響として説明できる。一方、Table 1を見ると、加熱時間が長く、イオン強度が高い程 D_f の値は大きく、最大2.8程度の値にまでなる。このことは、高濃度のNaCl添加系の凝集においては、クラスター・クラスター凝集モデルにおける粒子ないしはクラスターの並進運動による付着のみでなく、凝集体構造の再構成^{17,18)}が起こっていることを示唆している。

Fig. 2にCaCl₂添加系の静的光散乱測定結果を示す。NaCl添加系と異なり、散乱強度 I と散乱ベクトル q の間には直線関係が見られず、この測定領域においては凝集粒子がフラクタル構造を有していないことがわかる。CaCl₂添加系の凝集速度は、NaCl添加系よりも大きいことから、カルシウムイオン添加系においては本研究で用いた光散乱装置の測定限界以上の大きさの凝集体が形成されている可能性がある。

3.2 凝集ゲル中の凝集体のフラクタル構造¹⁹⁾

Fig. 3に応力-歪み曲線の一例を示す。図中の数字はタンパク質濃度である。このゲルの場合、応力-歪み曲線は上にやや凸の傾向が見られた。

Fig. 4に、塩無添加で調製したBSAゲルの線形限界歪み γ_0 および弾性率 E 、BSA濃度 ϕ に対する両対数プロットを示す。 γ_0 の値は ϕ の増加に伴い減少し、このゲルがstrong-linkゲルであることが確認できる。よって、strong-linkに関する(3)式を用いてフラクタル次元の値が2.00-2.07と求められた。なお、このゲルは、見かけ上透明で、レーザー共焦点顕微鏡によっても凝集体が観測されなかった。

Fig. 5にカルシウム塩を30mM添加して調製したBSAゲルの γ_0 および E の ϕ に対する両対数プロットを示す。 γ_0 の値は ϕ の増加に伴い増加し、このゲルがweak-linkゲルであることが確認できる。よって、weak-linkに関する(5)式を用いてフラクタル次元の値が2.82と求められた。

Fig. 6にFig. 5と同様にカルシウム塩を30mM添加して調製したBSAゲルのレーザー共焦点顕微鏡による画像を示す。左側の図がオリジナルの画像であり、 μm オーダーのサイズの凝集体が観測された。

Fig. 7にFig. 6の画像をbox-counting法によって処理した結果を示す。画像処理によって求められたフラクタル次元は2.81でFig. 5弾性率測定によって求められた結果とほぼ一致している。このことは、このゲルの弾性率の挙動が内部の μm オーダーの凝集体のフラクタル構造の反映であることを示している。

Table 2に、本研究で検討した各種タンパク質凝集ゲルに関するフラクタル解析の

結果をまとめて示す。このように様々な食品タンパク質凝集ゲルの弾性率が、フラクタル理論により記述された。また、添加塩の種類・濃度の違いにより、同一のタンパク質でもstrong-link、weak-link両方のタイプのゲルが得られた。この表によると、見かけ上透明なゲルの方がstrong-link、白濁したゲルがweak-linkとなっている傾向が見られる。

Shihら¹²⁾によると、ゲル中の凝集体が応力に対して柔軟に変形する構造を有している場合、ゲルはstrong-linkの挙動を示し、一方凝集体が比較的堅固な構造を有している場合にはweak-linkゲルの挙動を示す。既往の研究によれば、イオン強度の小さい条件で調製したBSAなどの加熱凝集体は、線状に近い構造であると報告されており^{20,21)}、本研究においてstrong-linkを示した透明なゲルの凝集体も同様な構造であると考えられる。一方、先に示したように、weak-linkの挙動を示したゲルの凝集体構造は、線状というよりむしろ塊状に近いものである。こうした凝集体構造の違いが、凝集体の柔軟性の違いをもたらし、strong-linkまたはweak-linkの挙動を示したと推察される。

4. 今後の課題

本研究では、タンパク質凝集ゲルの弾性率の挙動が内部の凝集体のフラクタル構造の反映であること、添加の種類を変えることによって、Shihの理論におけるweak-link、strong-link両方のタイプのゲルが得られることを明らかにした。ゲルの形成過程においては凝集体の再構成が起きていることが示唆された。しかし、透明なゲルに関しては共焦点顕微鏡によっては明確な凝集体構造が観察されなかった。おそらく、こうしたゲルの凝集体のスケールは、 μm 以下なのであろう。これらの凝集体構造の解析を行なうためには共焦点顕微鏡以外の手法によることが必要であると考えられ、今後の検討課題である。

5. 参考文献

- 1) B. B. Mandelbrot, "The Fractal Geometry of Nature" Freeman, San Francisco, 1982.
- 2) 高安 秀樹、「フラクタル」、朝倉書店、1986.
- 3) D. A. Weitz and M. Oliveria, *Phys. Rev. Lett.*, **52**, 1433-1436 (1984).
- 4) D. A. Weitz, J. S. Huang, M. Y. Lin and J. Sung, *Phys. Rev. Lett.*, **54**, 1416-1419 (1985).
- 5) T. Vicsek, "Fractal Growth Phenomena" World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1989.
- 6) P. Meakin, *J. Colloid Interface Sci.*, **102**, 491-504 (1984).
- 7) P. Meakin, T. Vicsek and F. Family, *Phys. Rev. B*, **31**, 564-569 (1985).
- 8) R. C. Ball, D. A. Weitz, T. A. Witten and F. Leyvraz, *Phys. Rev. Lett.*, **58**, 274-277 (1987).

- 9) B. Chu, "Laser Light Scattering" 2nd ed., Academic Press, Boston, San Diego, New York, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1991.
- 10) R. Klein, D. A. Weitz, M. Y. Lin, H. M. Lindsay, R. C. Ball and P. Meakin, *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **81**, 161-168 (1990).
- 11) K. S. Schmitz, "An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules" Academic Press, San Diego, 1990.
- 12) W.-H. Shih, W. Y. Shih, S.-I. Kim, J. Liu and I. A. Aksay, *Phys. Rev. A*, **42**, 4772-4779 (1990).
- 13) W.-H. Shih, W. Y. Shih and I. A. Aksay, in "Fractal Aspect of Materials: Disordered Systems" ed. by D. A. Weitz, L. M. Sander and B. B. Mandelbrot, Materials Research Society, Pittsburgh, 1988, p.239.
- 14) B. H. Kaye, in "The Fractal Approach to Heterogeneous Chemistry" ed. by D. Avnir, John Wiley&Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, and Singapore, 1989, pp.55-66.
- 15) "Concise Encyclopedia Biochemistry" 2nd Ed., ed. by T. Scott and M. Eagleson, de Gruyter, Berlin and New York, 1988, pp.19-20.
- 16) T. Hagiwara, H. Kumagai and K. Nakamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1757-1763 (1996).
- 17) P. Meakin and R. Jullien, *J. Phys. France*, **46**, 1543-1552 (1985).
- 18) P. Meakin and R. Jullien, *J. Chem. Phys.*, **89**, 246-250 (1988).
- 19) T. Hagiwara, H. Kumagai and K. Nakamura, *Food Hydrocolloids*, in press.
- 20) A. H. Clark, F. J. Judge, J. B. Richards, J. M. Stubbs and A. Suggett, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **17**, 380-392 (1981).
- 21) M. Murata, F. Tani, T. Higasa, N. Kitabatake and E. Doi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 43-46 (1993).

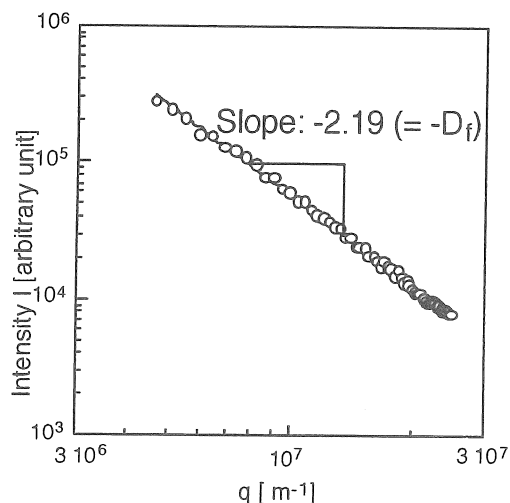


Fig. 1 Dependence of Scattered Light Intensity I of Heated BSA Solution on q

Solvent: 50mM HEPES buffer (pH7.0, ionic strength = 0.2 [M]).
Heating time: 90min.

Table 1 Dependence of Fractal Dimensions D_f of Various Ionic Strength I on Heating Time.

Solvent: 50mM HEPES buffer (pH7.0, NaCl was added).

Ionic strength I [M]	Heating time [min]	Fractal dimension D_f
0.1	90	2.11
0.2	40	2.08
	90	2.19
	120	2.27
0.3	17	2.08
	25	2.39
0.4	20	2.53
0.5	16	2.50
0.6	13	2.84
	10	2.12
	11	2.71

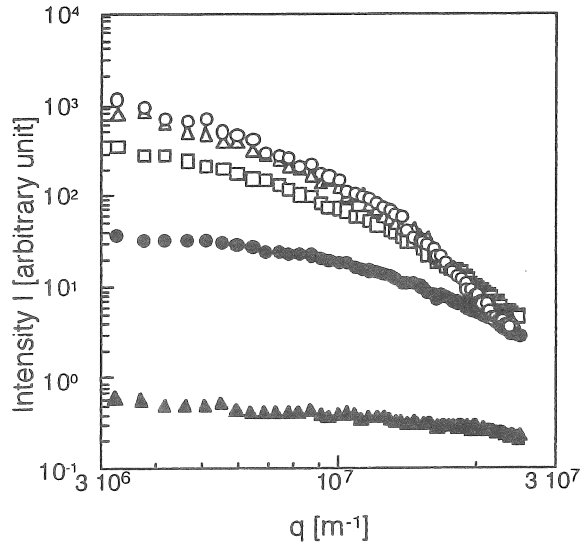


Fig. 2 Dependence of Scattered Light Intensities I of Heated BSA Solutions Heated for Various Times on q .

Solvent: 50mM HEPES buffer (pH7.0, CaCl_2 concentration was 5mM).

Heating time: \circ , 45min; \triangle , 30min; \square , 10min; \bullet , 5min; \blacktriangle , 2min.

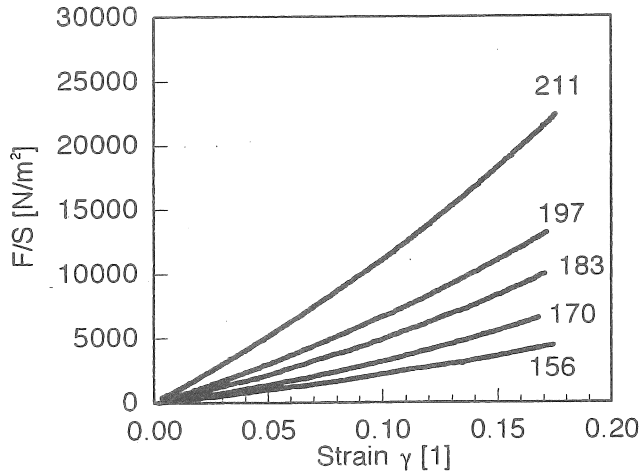


Fig. 3 Typical Stress-Strain Curves for BSA Gel.

Solvent 50 mM HEPES (pH 7.0, 30 mM CaCl_2)

The numbers in the figure represent the concentration of gels.

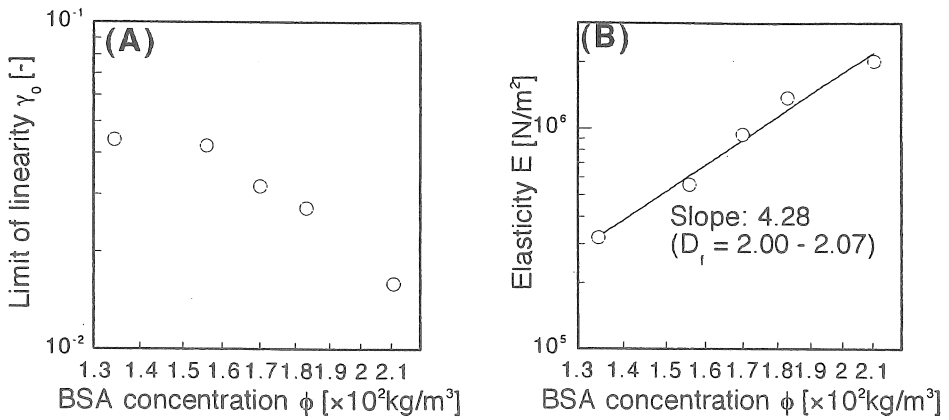


Fig. 4 The Double Logarithmic Plots of γ_0 vs. ϕ (A) and E vs. ϕ (B) for BSA Gel. Solvent: 50mM HEPES buffer (pH 7.0, no salt was added).

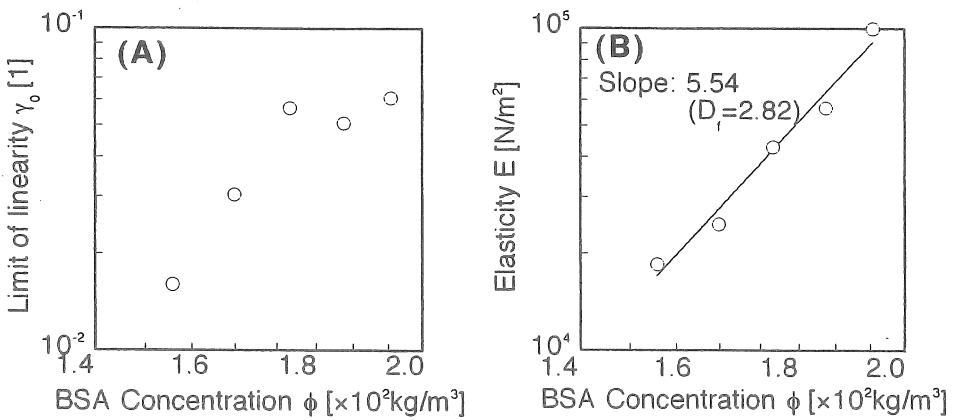


Fig. 5 The Double Logarithmic Plots of γ_0 vs. ϕ (A) and E vs. ϕ (B) for BSA Gel. Solvent: 50mM HEPES buffer (pH 7.0, 30mM CaCl_2).

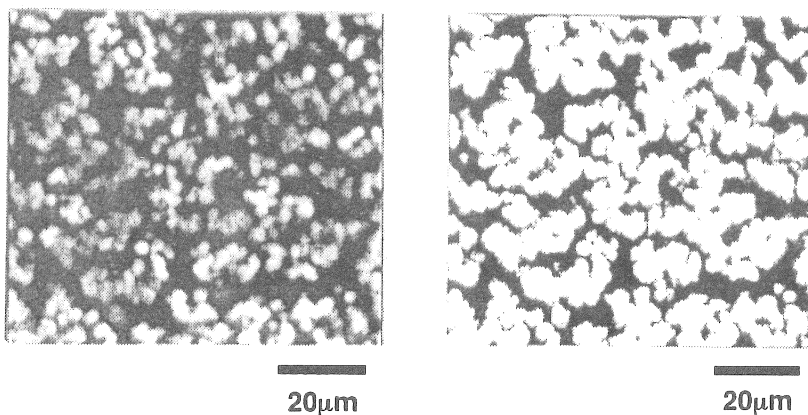


Fig. 6 Photographs Obtained Using a Confocal Scanning Laser Microscopy for Aggregates in the BSA Gel Prepared with 50 mM HEPES Buffer Containing 30 mM CaCl_2 as a Solvent. (left) an original image, (right) digitized image. BSA concentration: 211 kg/m^3 .

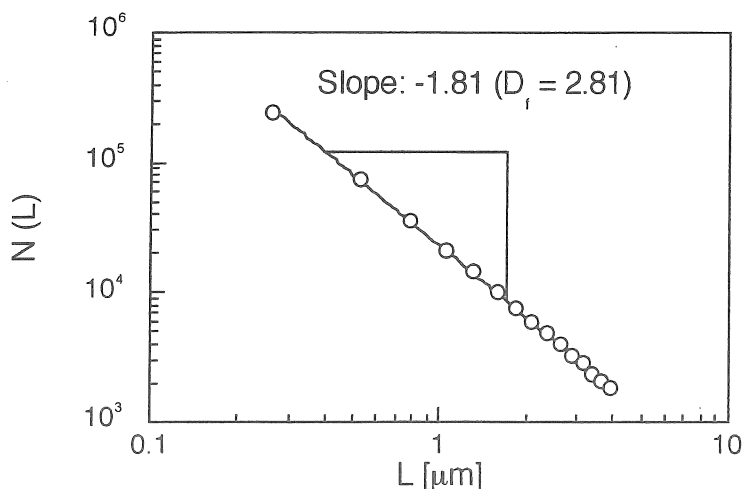


Fig. 7 Plots for Estimation of Fractal Dimension D_f for Aggregates in the Gels Prepared with 50 mM HEPES Buffer (pH 7.0, 30mM CaCl_2) as a Solvent. BSA concentration: 211kg/m³.

Table 2 Fractal Analysis of Aggregates in Protein Gels.

Protein	Gelation condition	Link type	Fractal dimension D_f		Gel appearance
			E vs. ϕ	$N(L)$ vs. L	
BSA	I=1.0; NaCl	Weak	2.67	-	Turbid
	30mM CaCl_2	Weak	2.82	2.80	Turbid
	5mM CaCl_2	Weak	2.61	2.68	Turbid
	No salt added	Strong	2.00-2.07	-	Transparent
β -LG	I=1.0; NaCl	Weak	2.62	2.70	Turbid
	30mM CaCl_2	Weak	2.69	2.70	Turbid
	No salt added	Strong	2.14-2.20	-	Transparent
11S Globulin	GLD 0.1g/g protein	Weak	2.70	-	Turbid
Casein	GLD 0.25g/g protein	Weak	2.65	-	Turbid

Effect of Metal Salts on Fractal Structure of Protein Aggregate Gels and Their Elastic Behavior

Kozo Nakamura and Hitoshi Kumagai

Department of Applied Biological Chemistry,
The University of Tokyo

Summary

Metal salts influence mechanical properties such as viscosity and elasticity of food gels. Many researchers have investigated the effect of salts added on mechanical properties, but the relationship between the microscopic structure of the gels containing metal salts and physical properties of the gels has not been clarified due to disordered shape of the inner structure. Recently, fractal analysis has attracted attention as a quantitative analytical method that can characterize many kinds of disordered shapes.

In this study, fractal structure of the protein aggregates containing metal salts such as NaCl was measured, and the elastic behavior of protein aggregate gels was analyzed with a concept of fractal.

First, the structure of aggregates formed by heating dilute BSA solution containing metal ions was analyzed using the static light scattering method. BSA was dissolved in HEPES buffer at pH 7.0 and heated at 95 °C. For the aggregates prepared by heating BSA solutions with NaCl, the values of D_f were evaluated to be 2.1 to 2.8, increasing with the increase in NaCl concentration. On the other hand, for the aggregates prepared by heating BSA solutions with CaCl_2 , the fractal structure was not observed.

Second, the fractal structure of aggregates in protein gels and those containing metal salts was examined: four proteins were used; (1) BSA, (2) β -lactoglobulin (β -LG), (3) 11S soybean globulin, (4) casein. From the concentration dependence of the gel elasticity, the fractal dimension D_f of the aggregates in the gels was evaluated, using the theory of Shih et al. It was confirmed that both the strong- and weak-link type gels in the theory of Shih et al. were obtained by varying the types and concentration of metal salts. In addition, a micrometer scale structure of the aggregates in the gels was observed using confocal scanning microscopy. As for the BSA and β -LG gels containing CaCl_2 (weak-link type), the values of D_f were also evaluated from the analysis of the gel image obtained with confocal scanning laser microscopy, the values being close to those evaluated from the gel elasticity measurements.